

BAB III.

METODE PELAKSANAAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang pada bulan Maret sampai Oktober 2018.

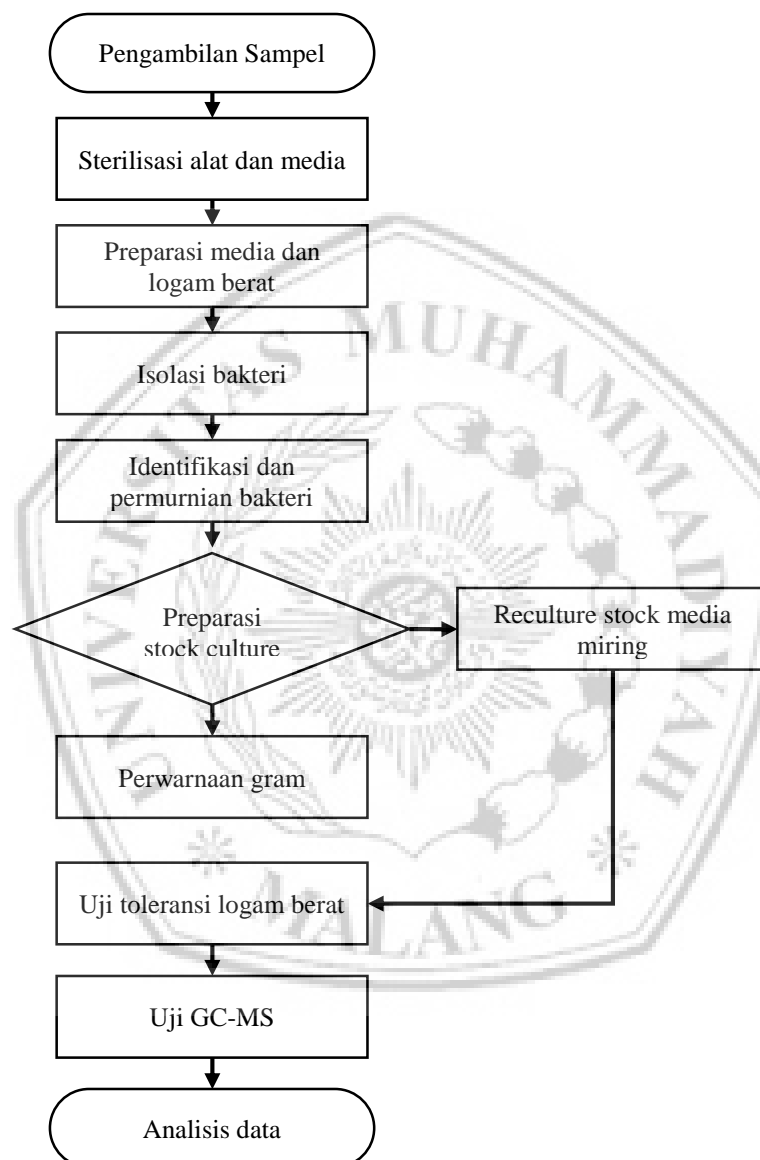
3.2 Bahan dan Alat

Peralatan yang digunakan adalah *ice box*, *shaker*, *laminar air flow* (LAF), *autoclave*, mikropipet ukuran 0-10 µl, 10-100 µl dan 100-1000 µl, *venoject tube*, tip mikropipet warna biru, kuning dan putih, *tube* volume 2000 µl, jarum ose, *beaker glass*, tabung reaksi, batang penyebar, erlemeyer volume 250-1000 ml, cawan petri, *object glass*, bunsen, timbangan analitik, botol duran volume 500 ml, oven, *microwave*, *sentrifuge*, *vortex*, *colony counter*, kulkas, spektrofotometer dan *Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS).

Bahan yang digunakan adalah sampel tanah atau air bekas limbah industri PT. Nasional Djawa Kulit, Logam Berat (Pb dan Hg), *agar powder*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , KOH, MgSO_4 , FeSO_4 , NaCl, glukosa, *aquadest*, *etanol absolute*, media *Lysogeny broth*, media M63, tripton, triptopan, yeast estrak, plastik PP, karet, kertas bekas, aluminium foil, plastik wrap, kapas, larutan kristal violet, larutan iodium gram, alkohol 95%, dan safranin.

3.3 Diagram Alir Penelitian

Tahapan penelitian seperti yang diuraikan dalam diagram alir berikut (Gambar 2).



Gambar 2. Diagram alir penelitian

3.4 Rancangan Penelitian

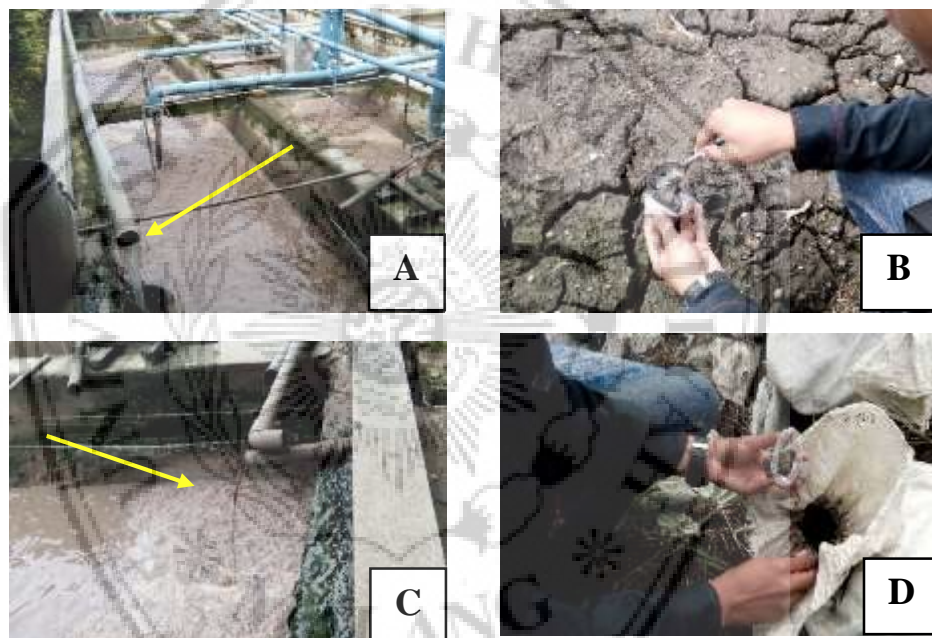
Penelitian ini menggunakan rancangan kualitatif. Penelitian dilakukan dengan mengidentifikasi bakteri hasil limbah industri pabrik kulit menggunakan pedoman buku Hadioetomo 1985.

3.5 Tahapan Penelitian

Pelaksanaan penelitian mengikuti beberapa tahapan sebagai berikut.

3.5.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada perusahaan industri kulit yaitu PT. Nasional Djawa Kulit. Perusahaan ini berada di Jl. Raya Singasari No. 81, Kecamatan Singosari, Kabupaten Malang. Pengambilan lumpur aktif dan air bekas penyamaan kulit sebagai sampel seperti gambar 3.



Gambar 3. Tempat pengambilan sampel di Pabrik Kulit (A) Sampel 1. (Saluran pembuangan pertama); (B) Sampel 2. (Bak *drying* lumpur aktif); (C) Sampel 3. (saluran pembuangan setelah pengolahan); (D) Sampel 4. (Lumpur aktif yang sudah dikemas).

Berdasarkan gambar 3 pengambilan sampel pada setiap lokasi didapatkan 4 sampel dengan metode sampel acak. Sampel setiap tempat diambil ditiga titik yang berbeda kemudian dihomogenkan. Lumpur aktif atau air bekas limbah yang telah diambil kemudian dimasukkan ke dalam plastik dan disimpan dalam *ice box*.

3.5.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dicuci terlebih dahulu. Setelah dicuci kemudian peralatan direndam dalam larutan NaOCl 30% selama satu malam dan dikeringkan atau bisa dioven. Sterilisasi alat menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 *atm* selama 60 menit (Novel, Wulandari, & Safitri, 2010). Tabung rekasi dalam proses sterilisasi cukup dibalik dan dimasukan wadah plastik. Bagian mulut erlemeyer ditutup terlebih dahulu dengan menggunakan *aluminium foil* dan dibungkus dengan plastik serta diikat dengan karet gelang. Sedangkan untuk cawan petri dibungkus dengan kertas dan dimasukan dalam kantong plastik (Hadioetomo, 1985).

Steril bahan dilakukan dengan menimbang semua bahan yang dibutuhkan dan mencampurnya hingga homogen. Jika perlu bahan yang sudah dicampur dapat dimasukan *microwave* agar memudahkan dalam proses penghomogenan. Pembuatan media menggunakan aquadest agar media yang dibuat terhindar dari kontaminasi. Kemudian mulut erlemeyer ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik. Steril bahan dilakukan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 *atm* selama 10-15 menit (Hadioetomo, 1985).

3.5.3 Preparasi Media *Lysogeny Broth* (LB)

Menimbang bahan tripton 1000mM, *yeast extract* 500 mM, NaCl 500 mM, agar 15 gram. Penambahan agar dilakukan jika media yang dibuat media padat. Kemudian semua bahan dimasukan dalam erlemeyer dan di tambahkan *aquadest* sampai satu liter. Memasukan bahan yang dibuat kedalam *microwive* agar memudahkan proses penghomogenan. Setelah homogen kemudian mulut erlemeyer

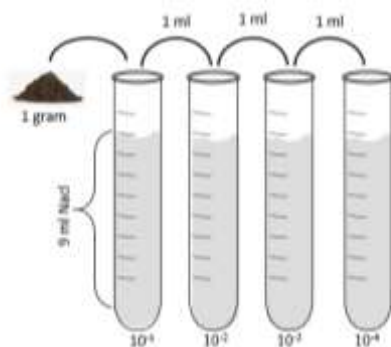
ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik. Kemudian bahan disteril dengan *autoclave* dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 10-15 menit (Sari & Apridamayanti, 2014).

3.5.4 Preparasi Media Padat M63 dan Logam Berat

Menimbang agar 2% (20 gr/ L), KH_2PO_4 100mM, KOH 750 mM, MgSO_4 0,16 mM, FeSO_4 3,9 mM, glukosa 20 g, dan 10 ppm logam berat (Hg, Pb) untuk kebutuhan 1 media padat berdasarkan penelitian Ikhwan, Yuwono dan Widada, (2011) dan dimodifikasi. Mencampur media tersebut pada erlenmeyer dan dilakukan sterilisasi media pada *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 10-15 menit. Menuang larutan secara merata pada *petridish* dengan ketebalan media $\pm 1\text{cm}$ (5-10 ml media) dan memberi label. Melakukan sterilisasi media padat dengan LAF selama 1 jam sebelum melakukan inokulasi sampel.

3.5.5 Isolasi Bakteri Limbah Industri

Melakukan pengenceran dengan menggunakan 1 gram lumpur aktif atau 1 ml air bekas industri kulit dilarutkan kedalam 9ml NaCl steril. Setelah itu, tabung dikocok dicocok agar homogen dan diambil 1 ml untuk pengenceran selanjutnya. Pengenceran yang dilakukan adalah pengenceran bertingkat 10^{-1} sampai 10^{-4} . Mengambil sampel dengan mikropipet sebanyak 1 ml pada pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-4} , kemudian meneteskan secara merata pada media padat *Lysogeny Broth* (LB). Setelah semua selesai petri ditutup dengan plastik wrap dan melakukan inkubasi selama 2 hari (Novel, Wulandari, & Safitri, 2010).



Gambar 4. Ilustrasi tahapan pengenceran bertingkat modifikasi dari buku (Novel, Wulandari, & Safitri, 2010)

3.5.6 Identifikasi dan Pemurnian Koloni Bakteri

Melakukan permurnian bakteri dengan mengidentifikasi morfologi koloni yang terbentuk (bentuk, tepian, elevasi dan warna) dan metode *streak*. Metode *streak* dilakukan dengan mengambil isolat koloni bakteri dan melakukan penggoresan menggunakan jarum ose secara zig-zag kedalam petridish berisi media M63 + logam berat 10 ppm. Memberi label pada masing-masing *petridish* sesuai isolat bakteri yang ditumbuhkan. Menginkubasi bakteri selama 24 jam, jika masih terdapat kontaminan maka dilakukan penggoresan ulang. Hasil penggoresan tanpa kontaminan kemudian diidentifikasi dengan pedoman Hadioetomo, (1985). Memberikan label sesuai dengan hasil identifikasi yang didapatkan.

3.5.7 Preparasi *Stock-Culture* Isolat Bakteri

Bakteri yang telah teridentifikasi kemudian ditumbuhkan pada media miring *LB* (*Lysogeny Broth*) dengan 10 ppm logam berat. Membuat media *LB* dengan menghomogen tripton 10 gram, NaCl 5 gram, yeast estrak 5 gram, agar 15 gram, 10 ppm logam berat dan menambahkan aquadest sampai 1 liter dimodifikasi dari Sari dan Apridamayanti (2014). Melakukan sterilisasi media cair pada

autoclave suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 10-15 menit. Menuang media pada tabung reaksi untuk dibuat media miring. Menginokulasi bakteri hasil permunian pada media miring LB dan mendinginkan sampel pada suhu ruang sampai bakteri tumbuh (24 jam). Menyimpan sampel yang sudah tumbuh dengan suhu 4°C didalam kulkas/pendingin (Hadioetomo, 1985).

3.5.8 Preparasi Uji Toleransi Bakteri Pada Media M63

Menimbang bahan yaitu KH₂PO₄ 100mM, KOH 750 mM, MgSO₄ 0,16 mM, FeSO₄ 3,9 mM, glukosa 20 g, 10 ppm logam berat dan menambahkan aquadest sampai satu liter. Melakukan sterilisasi media cair pada *autoclave* suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 10-15 menit. Menuang media pada tabung reaksi 10 ml dan menginokulasi bakteri dari *stock cultur* satu lup penuh. Kemudian menutup dengan kapas dan memberikan label sesuai bakteri yang di inokulasikan. Selanjutnya *dishaker* selama 24 jam untuk mengetahui bakteri yang diujikan toleran atau tidak. Semakin keruh bakteri yang dihasilkan pada proses *shaker* 24 jam maka bakteri tersebut dapat toleran terhadap media yang diujikan. Kemudian sampel yang tahan terhadap media M63 di simpan untuk dijadikan *stock cultur* (Ikhwan, 2006).

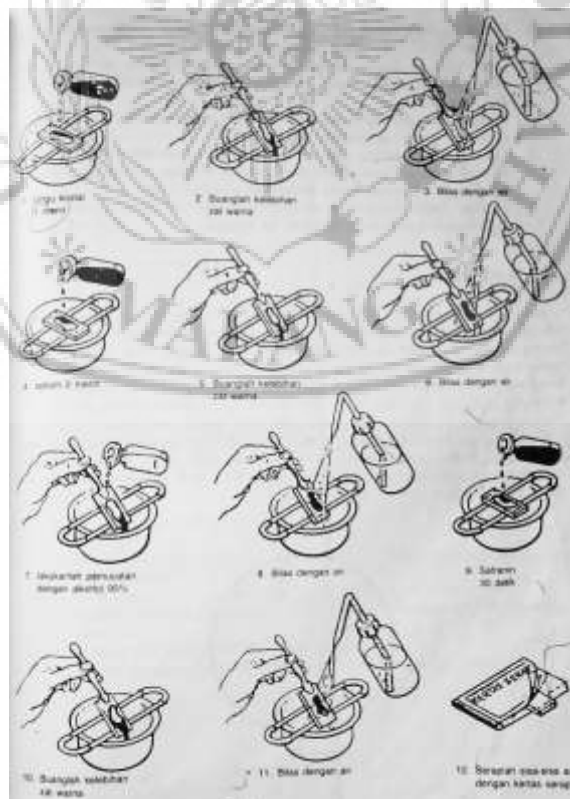
3.5.9 Uji Toleransi Bakteri Bertaraf

Membuat media cair M63 dengan penambahan kadar logam berat bertaraf 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Inokulan dari *stock-culture* sebanyak 1ml diinokulasi ke dalam media cair M63 dan diinkubasi selama 24 jam. Selama inkubasi, dilakukan pengamatan OD (*Optical Density*) menggunakan *spektrofotometer* dengan λ 420 nm setiap 2 jam sekali (Ikhwan,

2006). Suspensi bakteri pada taraf tertinggi kemudian disimpan dalam kulkas untuk kebutuhan selanjutnya.

3.5.10 Perwarnaan Gram

Melakukan penyiapan olesan bakteri dengan cara menyiapkan *stock culture* dari media padat atau cari. Apabila dari medium cair ambil 1-2 lup penuh suspensi organisme pada kaca objek, sebarkan organisme hingga rata seluas area yang telah disediakan kemudian biarkan kering udara atau dibantu dengan api bunsen. Untuk olesan bakteri dari medium padat, dapat dilakukan dengan menaruh 1-2 lup *aquadest* pada kaca objek. Tambahkan sedikit bakteri dari cawan petri dan kemudian ratakan (Hadioetomo, 1985). Biarkan kering udara atau dibantu dengan api bunsen. Selanjutnya untuk proses perwarnaan dapat dilihat gambar 5.



Gambar 5. Cara perwarnaan gram (Hadioetomo, 1985).

3.5.11 Uji Fitohormon Gas Chromatography–Mass Spectrometry

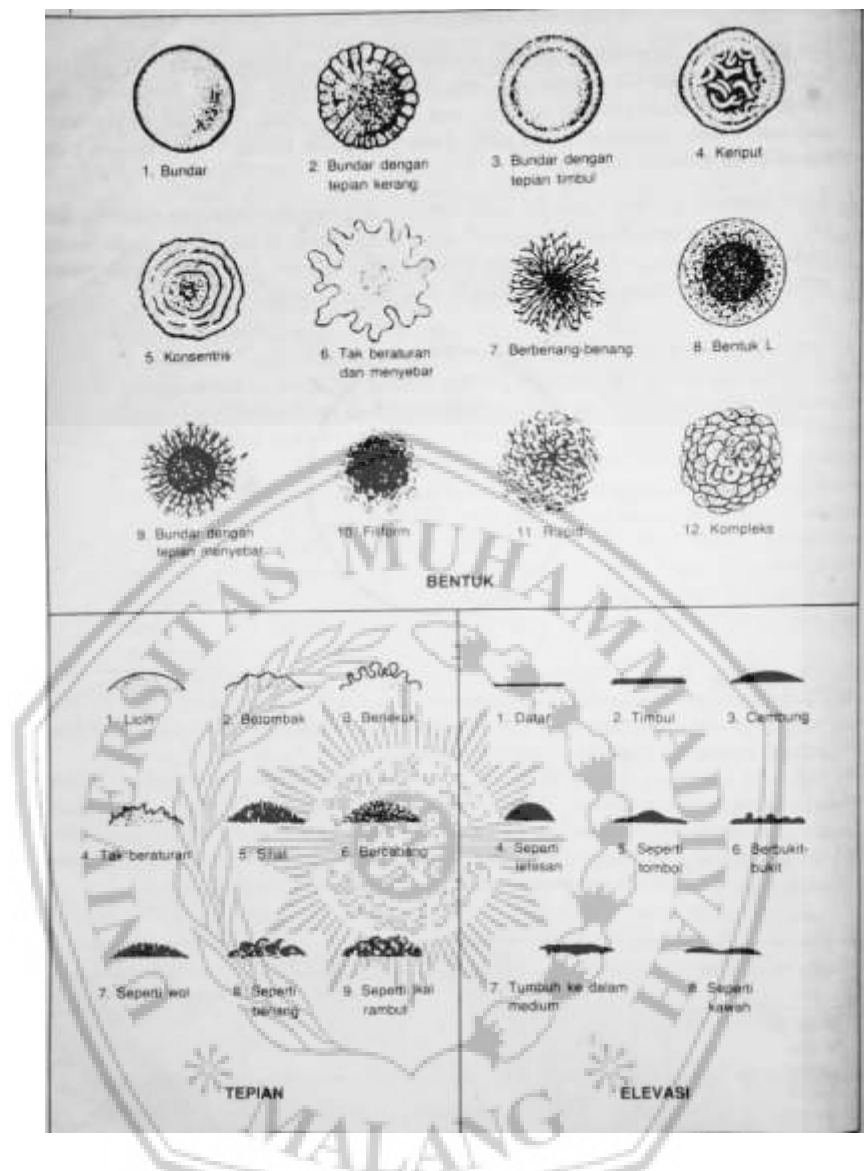
Melakukan pengujian kemampuan satu bakteri terbaik dan terendah dalam menghasilkan metabolit sekunder. Analisis kemampuan bakteri menggunakan *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS) berdasarkan Ikhwan, dkk (2011) dan dimodifikasi. Langkah awal dalam pengujian produksi hormon pertumbuhan (ZPT) pada bakteri menggunakan GC-MS adalah isolat hasil uji toleran terhadap logam Pb (timbal). Larutan medium cair M63 + 1 ppm triptofan 9 ml disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan diambil sebanyak 2 ml dan dilarutkan dengan etanol absolut dingin (disimpan pada suhu 4°C selama ± 4 jam) sebanyak 2 ml. Selanjutnya larutan divortex hingga homogen (2 menit). Larutan ditambah dengan etanol absolut 4 ml dan dikocok selama 25 kali. Larutan disentrifuge kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Membuang supernatan dan meresuspensi hasil endapan (*pellet*) menggunakan etanol absolut sebanyak 100 μ l. Memindahkan hasil suspensi ke dalam tube berukuran 2 ml. Tahap terakhir adalah melakukan uji produksi hormon pertumbuhan dan bioremediasi pada isolat yang terbaik dan terendah dalam meremediasi logam berat pada media M63 dan 100 ppm Pb (timbal) menggunakan GC-MS. Kondisi GC-MS yang digunakan dapat dilihat pada lampiran 12.

3.6 Pengumpulan dan Analisis Data

Pengumpulan dan analisis data penelitian ini meliputi:

1. Keragaman koloni bakteri

Hasil isolasi bakteri yang dilakukan kemudian diidentifikasi dengan pendoman buku Hadioetomo (1985). Identifikasi koloni bakteri meliputi bentuk, elevasi, tepian dan warna.



Gambar 6. Literatur identifikasi koloni bakteri (Hadioetomo, 1985).

2. Perwarnaan Gram

Hasil yang didapatkan dari proses perwarnaan di Lab Biomed UMM kemudian dilanjutkan dengan proses pengamatan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x dengan bantuan cairan emersi. Kenampakan yang berhasil diamati kemudian dikelompokkan berdasarkan warna bakteri. Pengelompokan bakteri dibagi menjadi 2 yaitu bakteri gram negatif (merah) dan bakteri gram positif (ungu) (Hadioetomo, 1985).

3. Uji toleransi bakteri

Penentuan isolat bakteri terbaik dilakukan dengan menghitung nilai OD menggunakan alat *spektrofotometri* dimana isolat bakteri terbaik akan mengalami pola pertumbuhan yang stabil. Penghitungan nilai OD menggunakan λ 420 dengan satuan (ppm/persen). Menghitungan laju pertumbuhan bakteri menggunakan rumus:

$$\text{Laju pertumbuhan} \left(\frac{\text{ppm}}{\text{persen}} \right) = \text{OD akhir (24 jam)} - \text{OD awal (0 jam)}$$

3.7 Pengumpulan dan Penyajian Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dilakukan secara deskriptif dalam bentuk gambar, grafik, dan tabel. Data gambar disajikan dalam hasil identifikasi 15 bakteri hasil isolasi dan 8 hasil uji pada toleransi logam berat. Data grafik dan tabel disajikan dalam hasil analisis *Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS). Data-data yang diperoleh kemudian dianalisis secara kualitatif berdasarkan literatur-literatur terkini tentang mikrobiologi.